

**Immunelektrophoretische Studien zur Frage der Identität
menschlicher Organ- und Serumproteine
(Vergleichende Untersuchungen mit Anti-Humanserum)**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

zu

Erlangen

Vorgelegt von

Gertraud Schernthaner

Wunsiedel

1960

Referent: Prof. Dr. med. N. Henning

Dekan: Prof Dr. med. E. Schreck

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 11. 1960



IMMUNOELEKTROPHORETISCHE STUDIEN ZUR FRAGE DER IDENTITÄT MENSCHLICHER ORGAN- UND SERUMPROTEINE

F. SCHEIFFARTH, H. GÖTZ UND G. SCHERNTHANER

Medizinische Universitätsklinik, Erlangen (Deutschland)*

(Eingegangen den 31. Dezember, 1960)

Der Aufbau von Organen hat im Rahmen physiologisch-chemischer sowie auch klinischer Fragestellungen mit Bezug auf Stoffwechselvorgänge zunächst das Interesse des analytischen Chemikers geweckt. Dabei ergaben sich Befunde, die für eine Organ-individualität und damit zugleich für die Organspezifität, insbesondere von Eiweissen, sprechen. Diese Annahme stützt sich auf chemische Organanalysen, die deutliche Abweichungen z.B. in der Aminosäurezusammensetzung verschiedener Organ-eiweisse zeigen^{1, 2}. Auch von seiten der Immunologie wurde dieser Fragenkomplex mehrfach angegangen³⁻⁶. Nach den Untersuchungen von DOERR³ scheint eine Or-ganspezifität immunologisch allerdings nicht vorzuliegen.

Mit immunoelektrophoretischer Technik liegen u. W. nur ganz vereinzelt Unter-suchungen zur Charakterisierung von Organeiweissen vor⁷⁻¹⁰. Sie wurden für spezielle Fragestellungen, so beispielsweise zur Aufklärung struktureller Besonderheiten, vor-genommen. Dabei wurde natürlich auch auf die Identität von Organ- und Serum-proteinen eingegangen. Jedoch schien es uns gerechtfertigt, systematische Studien an verschiedenen menschlichen Organextrakten im Vergleich zu einem Normalserum immunoelektrophoretisch vorzunehmen.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Zur Untersuchung gelangten Organe von der Leiche, und zwar Leber, Niere, Milz, Herzmuskulatur, Skelettmuskulatur und Magenschleimhaut.

Es wurde darauf geachtet, dass die hier verwendeten Organe keine pathologischen Veränderungen zeigten, und dass sie nicht später als 24 Stunden *post mortem* zur Verarbeitung kamen. Hinsichtlich des Alters und des Geschlechts der Verstorbenen wurde keine Auswahl getroffen.

METHODIK

(1) *Aufbereitung der Organe*

Die oben genannten Organe wurden zunächst in dünne Scheiben geschnitten und zur groben Entblutung mehrmals in Eiswasser gewässert. Soweit notwendig und möglich, wurden bindegewebige Anteile entfernt. Darauf wurden die so vorbereiteten Organe weiter zerkleinert und mehrmals gewaschen, bis makroskopisch keine Blut-spuren mehr nachweisbar waren.

Eine Sonderbehandlung erforderte die blutreiche Milz. Nach Entfernung der

* Direktor: Prof. Dr. N. HENNING.

Kapsel und grober Zerkleinerung wurde hier häufiger gewässert und durch mehrmaliges Absedimentieren ein relativ blutfreier Organbrei gewonnen.

Im Falle der Magenschleimhaut wurde die Mucosa vorsichtig von der Muscularis getrennt und nach Zerkleinerung ebenfalls mehrmals gewaschen.

Die weitere Aufbereitung erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden:

Gefriertrocknung^{11, 12}. Die dünn auf ein Drahtnetz aufgelegten Organteilchen wurden mit Hilfe eines Gemisches von Kohlensäureschnee und Äther eingefroren und anschliessend im Exsiccator unter Vacuum getrocknet. Das völlig wasserfreie Substrat wurde dann in einem Mörser zu Pulver zerrieben und bis zur weiteren Verwendung unter Luftabschluss aufbewahrt.

Die Extraktion der Eiweisse erfolgte mit physiologischer Kochsalzlösung (1.5 g Substrat auf 30 ml NaCl-Lösung) bei 3–4°. Die so gewonnenen klaren Extrakte wurden hochtourig (15,000 U/min) in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert, der Überstand auf seinen Eiweissgehalt nach Kjeldahl untersucht und, je nach Konzentration, der Dialyse unterworfen.

Frischaufbereitung. Im Vergleich zu obiger Aufbereitungsart wurde eine technisch vereinfachte Behandlung der Organe vorgenommen. Hierbei wurde die weitgehend zerkleinerte und möglichst vollständig entblutete Organmasse zu gleichen Teilen mit physiologischer NaCl-Lösung vermischt und homogenisiert (Multimixzeit: 10 min). Nach Abzentrifugieren (40 min bei 0°; 15,000 U/min) ergab sich ein klarer Überstand, der je nach Eiweissgehalt eingengt wurde. Die Einengung erfolgte im Dialysierschlauch gegen 20%-iges Kollidon. Daneben wurde die Konzentrierung mittels eines Druckdialysators erreicht.

(2) *N-Bestimmung nach Kjeldahl*¹³

Zur Veraschung gelangten: 1 ml des 1 : 5 mit *aqua dest.* verdünnten Extraktes; 2 ml conc. H₂SO₄; 1 Messerspitze Selenreaktionsgemisch. Veraschungszeit: 1½ Std.

Die anschliessende Destillation erfolgte in einer für Mikro-Kjeldahl modifizierten Spezialapparatur. Der durch 33%-ige NaOH ausgetriebene NH₃ wurde in 10 ml 0.005 N H₂SO₄ übergeführt. Die Titration erfolgte mit 0.005 N NaOH. Als Indikator kam Mischindikator 5 von Merck zur Anwendung.

(3) *Gel-Diffusionstest nach Ouchterlony*¹⁴

Es wurde zunächst jeder Extrakt nach dem Diffusionsverfahren von Ouchterlony (Schalentest) auf die gegen Antinormalserum präzipitierenden Anteile untersucht. Hinsichtlich technischer Einzelheiten wird auf die einschlägige Literatur verwiesen¹⁴. Für den Schalentest wurde heissflüssiger Agar in einer Schichtdicke von 0.4–0.5 cm in chemisch reine Petri-Schalen gegossen. Nach dem Erkalten wurden in Abständen von 1 cm Aussparungen für die Aufnahme des Antigens bzw. des Immunserums ausgestanzt. In diese Vertiefungen wurden jeweils 0.2 ml des Organextraktes bzw. die gleiche Menge des Immunserums eingelassen.

(4) *Immunoelktrophorese*^{15–20}

Für die Immunoelktrophorese wurden mit gleichem Agar Glasplatten in einer Schichtdicke von 0.3 cm überzogen. Nach Erkalten wurden auch hier Aussparungen für die Aufnahme des Antigens (Organextrakt bzw. Serum), ausserdem Seitenkanäle für die antikörperhaltigen Immunseren (Anti-Humanserum) ausgestanzt. Die aufge-

tragenen Antigene wurden unter elektrischer Spannung (80–110 V Gleichspannung; 4–6 Std.) aufgetrennt und nach Abschluss der Elektrophorese die korrespondierenden Immunseren in die vorgesehenen Kanäle eingelassen. Für die hier vorliegenden Untersuchungen wurden im einzelnen folgende Mischungsverhältnisse gewählt: *Serum*: 0.2 ml Antigen (Serum); 0.3 ml *aqua dest.*; 0.5 ml Agar. *Organextrakte*: 0.4 ml Antigen (Organextrakt); 0.15–0.2 ml Agar.

Hiervon wurden jeweils 0.1 ml in die Auftragstellen eingelassen. Die nach einigen Tagen ausgebildeten Präzipitationslinien der Organextrakte wurden dann im Vergleich mit einem Normalserum beurteilt.

(5) Herstellung der Immunseren

Als Immunseren wurden Anti-Human-Kaninchenserum, sowie ein Anti-Human-serum vom Pferd* verwendet. Die Herstellung der Anti-Human-Kaninchenserum geschah in folgender Weise: Zwei Kaninchen von ca. 3000 g Körpergewicht erhielten pro Tier und Injektion am 1., 4., 7., 10., 13., 16., sowie 19. Tag jeweils 1.0 ml eines frischen Humanserumgemisches i.v. Am 4. Tag nach Abschluss der Sensibilisierungsserie wurde den Tieren erstmals Serum entnommen und auf seinen Antikörper-Gehalt geprüft. Die Immunseren erweisen sich, gemessen an den Präzipitationsergebnissen bei der Diffusionsmethode, als günstig und wurden infolgedessen für vorliegende Untersuchungen verwendet.

Da erfahrungsgemäss nach Absetzen der Sensibilisierung die zirkulierenden Antikörper im Verlauf der folgenden Wochen abgebaut werden, musste nach dreiwöchigem injektionsfreiem Intervall eine Wiedersensibilisierung vorgenommen werden, die dahin abgewandelt wurde, dass die Tiere jetzt täglich eine Injektion von 0.5 ml i.v. über 2×5 Tage mit Probeentnahme zwischen den beiden Injektionsserien appliziert bekamen.

Zur Färbung der Präzipitationslinien wurde ausschliesslich Amidoschwarz 10 B verwendet.

ERGEBNISSE

Die Untersuchungen mit der einfachen *Diffusionsmethode im Agargel* (Schalentest nach Ouchterlony) hatten ausschliesslich den Wert einer Voruntersuchung. Es sollte dabei festgestellt werden, ob und in welchem Ausmasse Präzipitationsreaktionen zwischen den einzelnen Organextrakten und einem Anti-Human-Immunserum zur Darstellung kommen.

Eine Beurteilung der Linien unter Berücksichtigung der Position untereinander und bei Vergleich mit den Linien eines Serums (Beurteilung von Kreuzungsphänomenen, Frage der Teilspezifität, sowie identische Linien) erwies sich deshalb als nicht erforderlich, weil ohnehin in den nachfolgend beschriebenen immunoelktrophoretischen Ergebnissen eine exakte Charakterisierung der zur Darstellung gekommenen Präzipitationslinien ermöglicht wird.

Ergebnisse der agarelektrophoretischen Auftrennung (einfache Gelelektrophorese, sowie Immunoelktrophorese mit nachfolgender Eiweissfärbung).

Bei der Beschreibung dieser Ergebnisse wird von den einzelnen Organen ausgegangen, wobei jeweils das Ergebnis der einfachen agarelektrophoretischen Auftren-

* Institut Pasteur, Paris.

nung und im Anschluss daran das der Immunelektrophorese wiedergegeben werden soll. Die Position der einzelnen Fraktionen und Präzipitationslinien wird mit Bezug auf ein jeweils unter gleichen Bedingungen aufgetrenntes Humanserum definiert, d.h. eine Proteinkomponente mit der Mobilität einer dem menschlichen Serum vergleichbaren Fraktion wird mit der dort üblichen Bezeichnung versehen. Das soll keineswegs bedeuten, dass die etwa mit α und β bezeichneten Organproteine mit den im menschlichen Serum vorkommenden α - und β -Fraktionen in allen ihren chemischen, physikalischen, immunologischen und biologischen Eigenschaften identisch wären. Zumindest bleibt eine diesbezügliche Erwägung der Diskussion vorbehalten.

Zur allgemeinen Orientierung sei hier das Ergebnis der Immunelektrophorese des verwendeten Vergleichsserums mit dem Anti-Humanserum (Anti-Humanserum vom Pferd, sowie Anti-Humanserum vom Kaninchen) wiedergegeben (Fig. 1a und b).

Mit dem Anti-Humanserum vom Pferd konnten folgende Komponenten des menschlichen Serums auspräzipitiert werden:

Eine Albuminvorfraktion, eine Albuminfraktion, zwei α_1 -Fraktionen mit der Mobilität der Albumine (darunter die sog. X-Fraktion), eine weitere α_1 - mit geringerer Mobilität, aber deutlich auspräzipitiert, eine kurzbogige Präzipitationslinie, die ebenfalls noch in den Bereich der α_1 -Fraktion zu liegen scheint, vier α_2 -Fraktionen, zwei β_1 -Fraktionen, die β_{2A} , die β_{2M} , sowie die γ -Fraktion. Somit sind es insgesamt 15 Präzipitationslinien. Darüber hinaus liegen im Albumin- α_1 -Bereich noch Präzipitate, die jedoch nicht exakt definierbar sind. Bei der Immunelektrophorese mit dem Anti-Human-Kaninchen-Serum ergab sich folgendes Bild: Eine Albuminvorfraktion, das Albumin, 2 α_1 -, 5 α_2 -, 2 β_1 -Fraktionen, die β_{2M} , sowie die γ -Fraktion.

Leber

Der nach Frischaufbereitung agarelektrophoretisch getrennte Leberextrakt zeigt folgende wesentliche Einzelheiten (Fig. 2): Eine relativ deutliche Albuminvorfraktion, eine Fraktion mit der Mobilität der Albumine, eine weitere mit der der Serum- α_1 -Globuline, eine etwa den α_2 -Globulinen vergleichbare, eine langsam wandernde α_2 -, eine stark anfärbbare β_1 -Fraktion, weiterhin eine Fraktion mit der Mobilität der M-Proteine und schliesslich eine schwache langausgezogene γ -Globulinfraktion.

In einzelnen Fällen lassen sich ausserdem noch Eiweisse vor der Albuminvorfraktion anfärben. Fig. 2 vermittelt weiterhin einen Eindruck über die quantitativen Verhältnisse. Demnach stechen die α_2 - und die β_1 -Fraktionen besonders hervor.

Immunelektrophoretisch (Fig. 3) zeigen sich am Leberextrakt eine Präzipitationslinie mit der Eigenschaft der Albumine, 2-3 α_1 -, 2-4 α_2 -, 1-2 β_1 -Fraktionen, eine zwischen β - und γ -Globulin gelegene β_2 -Komponente, die in ihrer Position zur γ -Präzipitationslinie, mehr randwärts verschoben ist. Meist stellt sich darüber hinaus eine dem β_{2A} -Globulin vergleichbare Fraktion dar.

Hinsichtlich der Intensität der Präzipitationslinien fallen die Fraktionen im Bereich der α -, der β - und auch der γ -Globuline auf. Allerdings ist die γ -Globulin-Fraktion nicht in allen untersuchten Fällen deutlich ausgeprägt.

Gelegentlich findet sich eine sehr feine, aber scharf begrenzte Präzipitationslinie nahe um die Auftragstelle oder von der Auftragstelle kathodenwärts. Uns erscheint dies insofern erwähnenswert, als sich eine Präzipitationslinie wiederholt an absolut gleicher Stelle, auch bei einfacher Gelelektrophorese ausgebildet hat.

Niere

Bei einfacher Agarelektrophorese eines Extraktes nach Gefriertrocknung und Proteinfärbung mit Amidoschwarz fallen im wesentlichen zwei Fraktionen auf, die eine, stärker angefärbte, mit der Wanderungsgeschwindigkeit des Serumalbumines bzw. der schnell wandernden α_1 -Globuline, eine zweite, offenbar quantitativ kleinere, mit der Mobilität der α_2 -Serumglobuline. Weiterhin lassen sich mit der Proteinfärbung Eiweisse vor der Albuminfraktion, desgleichen im Bereich der M-, sowie der γ -Globuline darstellen.

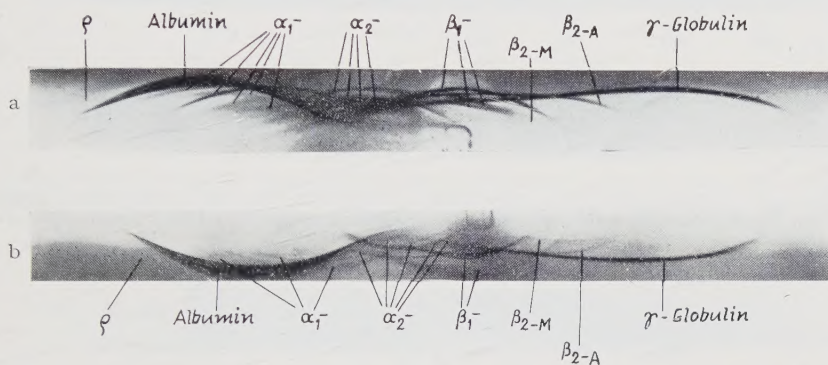


Fig. 1. (a), Immunoelektrophorese eines normalen Menscheners, gegen ein Anti-Humanserum vom Pferd auspräzipitiert. (b), Immunoelektrophorese eines normalen Menscheners, gegen ein Anti-Humanserum vom Kaninchen auspräzipitiert.

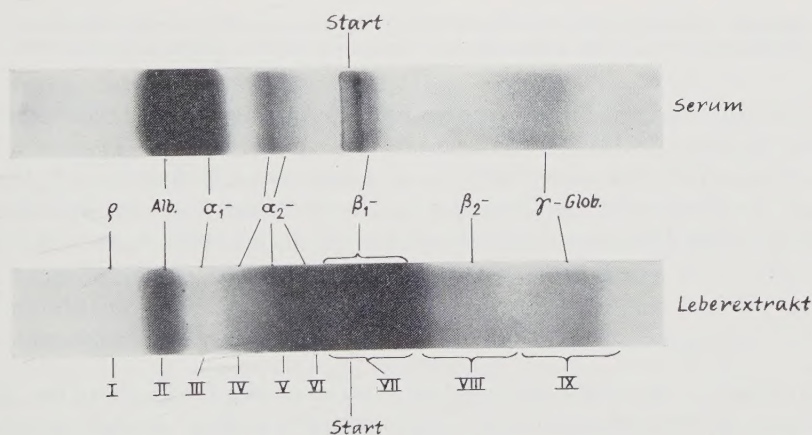


Fig. 2. Agarelektrophoresen eines normalen Menscheners (oben) und eines Leberextraktes (unten), ebenfalls vom Menschen. Die beiden Eiweiss-Suspensionen wurden unter gleichen Bedingungen analysiert.

Immunoelektrophoretisch zeigt ein nach Frischaufbereitungsmethode hergestellter Nierenextrakt (Fig. 4) folgende Komponenten: Eine Albuminfraktion, eine Albuminfraktion, 3 (bzw. 4) α_1 -, 4 α_2 -Globuline, 2 langsamer wandernde α_2 -Fraktionen

(an der Auftragstelle), 2 β_1 -Fraktionen, die β_{2A} -, eine sehr schwache β_{2M} - und eine γ -Fraktion.

Dagegen lassen die gefriergetrockneten Organextrakte sehr viel weniger Präzipitationslinien nachweisen: Eine schwache Albuminfraktion, eine Albuminfraktion, zwei α_1 -Komponenten, eine, allenfalls 2 Präzipitationslinien mit der Mobilität der Serum- α_2 -Proteine, um die Auftragstelle und kathodenwärts 2 Linien, sowie eine

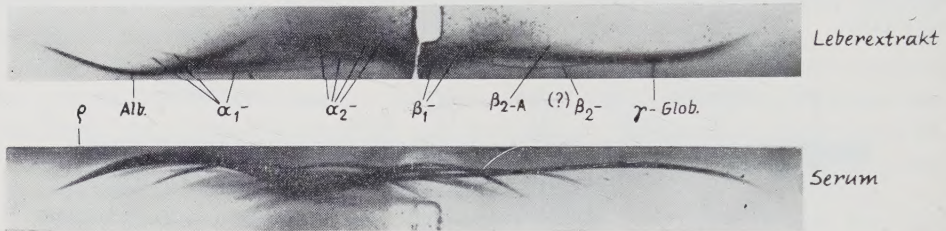


Fig. 3. Immunoelektrophoresen eines menschlichen Leberextraktes (oben) und eines Serums der gleichen Spezies (unten), beide gegen ein Anti-Humanserum vom Pferd auspräzipitiert.

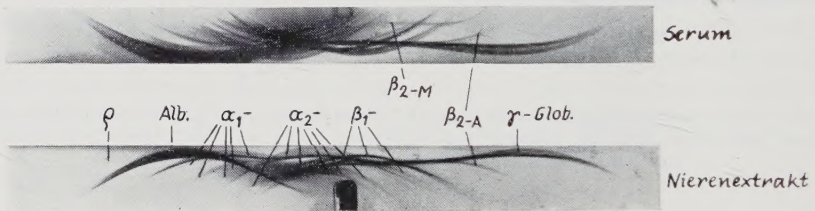


Fig. 4. Immunoelektrophoresen eines Menschenserums (oben) sowie eines menschlichen Nierenextraktes (unten), beide gegen ein Anti-Humanserum vom Pferd auspräzipitiert.

γ -Fraktion. In einzelnen Fällen konnten um die Auftragstelle parallel verlaufende Präzipitationslinien beobachtet werden.

Zwischen einer stark ausgeprägten α_1 - und einer ebenfalls deutlichen α_2 -Fraktion zeigt sich ein kontinuierlicher Übergang. Als Besonderheit fallen bei den Nierenextrakten die starke Albuminfraktion, sowie deutlich auspräzipitierte α_2 - und β_1 -Fraktionen auf.

Milz

Bei einfacher Agarelektrophorese und Proteinfärbung lässt sich an der Milz im wesentlichen ein anodisch wandernder Eiweisskomplex sichtbar machen, der in seiner Anfärbbarkeit Intensitätsunterschiede aufweist. Die schnellstwandernde Fraktion übertrifft die menschliche Albuminfraktion hinsichtlich Wanderungsgeschwindigkeit. Eine Differenzierung in scharf begrenzte Komponenten gelingt nicht. Ausserdem stellt sich schwach eine kathodenwärts bis in den Bereich der γ -Globuline reichende Fraktion dar.

Immunoelektrophoretisch zeigen sich folgende Komponenten (Fig. 5): Eine vor dem Albuminbereich verlaufende Präzipitationslinie, eine etwa mit den Albuminen

vergleichbare Komponente, 1–2 Linien im Bereich der α_1 -Fraktion, 3 Präzipitationslinien, die den α_2 -Serum-Globulinen entsprechen dürften, 2 kleine Fraktionen, die eine langsamere Mobilität als die genannten α_2 -Proteine aufweisen, 3 um die Auftragstelle, jedoch kathodenwärts auslaufende, also den β_1 -Globulinen vergleichbare Präzipitationslinien. Weiterhin lassen sich eine bis in den Bereich der γ -Globuline ausgezogene Komponente (β_{2A} ?) und schliesslich die γ -Globulinfraktion nachweisen.

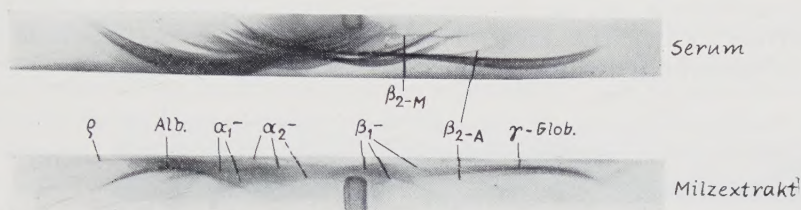


Fig. 5. Gegenüberstellung der immunoelektrophoretischen Analysen eines Menschenserums (oben) und eines menschlichen Milzextraktes (unten), beide gegen Anti-Humanserum vom Pferd ausgeprägt.

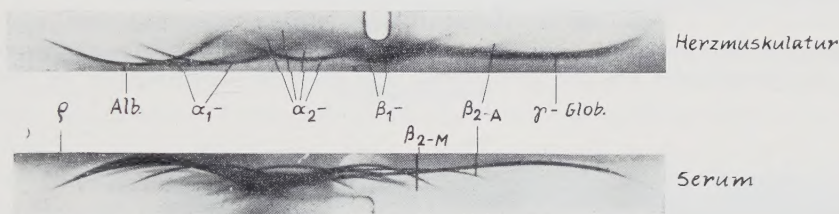


Fig. 6. Oben, Extrakt von Herzmuskulatur des Menschen. Unten, normales Menschenserum. Beide immunoelektrophoretisch mit einem Anti-Humanserum vom Pferd analysiert.

Herzmuskulatur

Bei einfacher Agarelektrophorese fallen bei optimalen Bedingungen an einem Herzextrakt im wesentlichen drei Komponenten auf: Eine mit der Mobilität der schnell wandernden α_1 -Serumglobuline oder des Serumalbumins, eine weitere mit den α_2 -Globulinen vergleichbare, eine dritte, die sich offenbar nur schwerlich vom Auftragstrich anodenwärts zu bewegen scheint. In einem Fall liessen sich auch vor der Albuminfraktion, sowie im Bereich der β_2 - und der γ -Globuline Proteine anfärben.

Immunoelektrophoretisch (Fig. 6) zeigen sich eine deutlich ausgeprägte Albuminfraktion, eine schnell wandernde α_1 -, eine normal wandernde α_1 -Fraktion, 2 stark, sowie 2 schwach ausgeprägte α_2 -, 2–3 β_1 -Globuline, eine β_2 (β_{2A})- und eine γ -Globulinfraktion. Die beschriebenen Linien weisen nahezu gleiche Intensität auf, Albumin ist in charakteristischer Weise im Vergleich zu einem Normalserum nicht so deutlich ausgeprägt.

Skelettmuskulatur

An der Skelettmuskulatur fällt bei einfacher Elektrophorese im Agargel ein von der Auftragstelle nur gering anodenwärts wandernder Eiweissblock auf. Es lassen sich darin zwei Komponenten abgrenzen, die am ehesten α_2 -Globulinen zuzuordnen

sind. Ausserdem werden Eiweiss-Spuren vor diesem Proteinkomplex im Bereich der α_1 -Globuline und auch der Albumine, desgleichen im Bereich der γ -Globuline schwach angefärbt.

Immunoelktrophoretisch lassen sich eine Albuminfraktion, eine mit dem Albumin wandernde α_1 -Fraktion, 2 langsamer wandernde α_1 -, 2 α_2 -Fraktionen, eine langgezogene vom α_2 - bis in den γ -Bereich sich erstreckende Fraktion, 2 β_1 -Komponenten, sowie eine mit den γ -Globulinen vergleichbare Präzipitationslinie darstellen.

Charakteristisch sind für die Skelettmuskulatur, abgesehen von einer deutlich auspräzipitierten Albuminfraktion, die weitbogige α_1 -, sowie die ebenfalls in weitem Bogen verlaufende randständige Präzipitationslinie der β -Globuline.

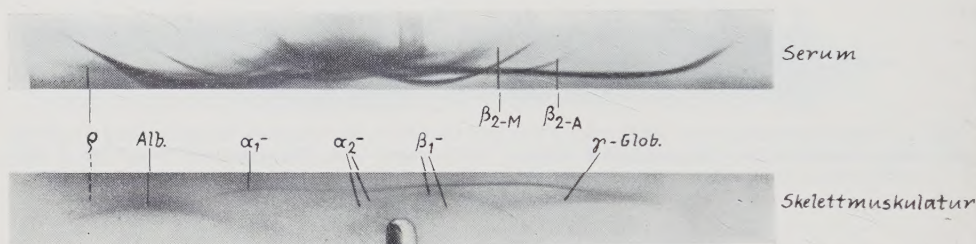


Fig. 7. Immunoelktrophoresen eines menschlichen Normalserums (oben) und von homogenisierter Skelettmuskulatur vom Menschen (unten), beide gegen Anti-Humanserum vom Pferd auspräzipitiert.

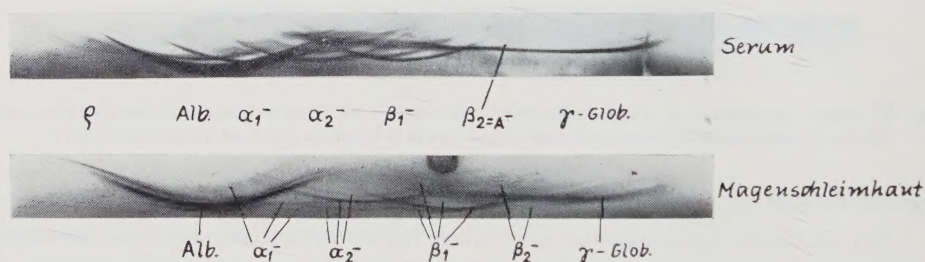


Fig. 8. Gegenüberstellung der Immunoelktrophoresen von Serum und Magenschleimhaut des Menschen. Als Immunserum wurde hier ein Anti-Humanserum vom Kaninchen verwendet.

Magenschleimhaut

Bei einfacher Agarelektrophorese mit Proteinfärbung fällt hier eine mit nahezu doppelter Geschwindigkeit wie die Albuminfraktion des Serums wandernde Protein-komponente auf, wobei der dem Auftragstrich zugewandte untere Rand etwa der Geschwindigkeit der Albuminvorfraktion entspricht. Man kann in diesem Block im Optimalfall zwei Komponenten erfassen. Ausserdem finden sich Proteine im Bereich noch vor dem beschriebenen Eiweisskomplex, desgleichen anodenwärts von der Auf-tragstelle und Spuren bis in den Bereich der γ -Globuline.

Immunoelktrophoretisch lassen sich an der Magenschleimhaut folgende Kom-ponenten darstellen: Eine Albuminvorfraktion—die allerdings nicht bei jeder Analyse reproduzierbar war—, eine Albuminfraktion, 1-2 mit dem Albumin wandernde α_1 -Fraktionen, eine langsamer wandernde α_1 -, 3 α_2 -Fraktionen, 4 β_1 -, 2 vom Auf-trag-

strich bis in die γ -Globulinzone reichende Fraktionen, von welchen die eine ausserhalb, die andere innerhalb der γ -Präzipitationslinie verläuft; schliesslich eine γ -Globulinfraktion.

Auffallend am Magen sind die relativ deutlich ausgeprägte Albumin-, sowie die γ -Globulinfraktion; auch sonst lassen sich die beschriebenen Linien klar darstellen.

DISKUSSION

Die einzelnen Organextrakte weisen nach einfacher agarelektrophoretischer Auftrennung und Proteinfärbung bei Vergleich mit einem Normalserum deutliche Unterschiede (1) in der Länge des Eiweiss-Spektrums (Mobilität), (2) in der quantitativen Zusammensetzung der Proteinanteile auf. Es lässt sich bereits auf Grund dieser Ergebnisse aussagen, dass jedes Organ sein eigenes Eiweissmuster besitzt. Grundsätzlich gleiche Erfahrungen wurden in der Literatur bei Analysen tierischer und auch menschlicher Organe angegeben²¹⁻²³.

Insbesondere sind hier die kürzlich von KESSEL²³ mitgeteilten agarelektrophoretischen Trennungen tierischer Organextrakte zu nennen. Aus dieser Arbeit geht im übrigen die Überlegenheit der Elektrophorese im Gelmilieu gegenüber der Papiermethode bei der Trennung solcher Extrakte hervor, was auch unseren Erfahrungen entspricht. Ein detaillierter Vergleich der Resultate mit den eigenen Untersuchungen bei menschlichen Organeiweiss-Suspensionen scheint uns jedoch im vorliegenden Zusammenhang insofern kein Diskussionsgegenstand, als bei den Untersuchungsergebnissen der verschiedenen Autoren Methodik und Versuchsanordnung vielfach erheblich differieren.

Die immunoelektrophoretischen Ergebnisse zeigen, dass bei allen hier untersuchten Organen eine Reihe von Präzipitationslinien zur Darstellung kommen, die teilweise, hinsichtlich ihrer Position und ihrer immunologischen Reaktion, mit entsprechenden Proteinsystemen des Serums identisch erscheinen. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Albumin, das—wenn auch quantitativ unterschiedlich—in praktisch allen untersuchten Organextrakten nachgewiesen werden konnte, sowie um mindestens je eine α_1 -, α_2 -, β_1 - und die γ -Globulinfraktion. Nicht in jedem Falle fanden sich die bekannten im Serum regelmässig vorhandenen β -Unterfraktionen, das β_{2A} - und das β_{2M} -Globulin. Darüber hinaus zeigen sich jedoch auch Präzipitate, die mit Serumproteinen nicht absolut vergleichbar sind; sie zeigen keine mit Serumproteinen konform gehende Mobilität und auch oft völlig andere Position. Diese Eigentümlichkeit mag entweder darin begründet sein, dass andersartige Proteine als sie im Serum vorkommen zur Darstellung gelangt sind, oder auch darin, dass trotz einer Identität mit Serumproteinen die elektrophoretische Mobilität einzelner Fraktionen zufolge der geringeren Eiweisskonzentration der Gewebsextrakte eine andere, meist grössere, ist. Jedenfalls beweist die Tatsache, dass mit einem Anti-Humanserum (Anti-Serum-Immunserum) gegen die hier untersuchten Organextrakte überhaupt Präzipitate entstehen, zumindest eine immunologische Identität entsprechend dargestellter Proteinkomponenten. Dass dennoch beim Vergleich von Organextrakten und Serum Unterschiede in der Mobilität und in der Form der Präzipitationslinien sichtbar werden, bzw. nicht alle dargestellten Präzipitate der Organextrakte mit dem Vergleichsserum zur Deckung kommen, dürfte vor allem durch die andersartige relative Komposition der Proteinanteile der verschiedenen Vergleichslösungen bedingt sein.

Im einzelnen seien nachfolgende Besonderheiten in der Darstellung der untersuchten Organproteine hervorgehoben:

(1) *Leber*. Der Literatur ist zu entnehmen, dass bei immunoelektrophoretischer Untersuchung von Leberhomogenisaten 9 Komponenten mit jeweils zwei bis drei Subfraktionen, d.h. insgesamt 18 bis 20 Einzelproteine differenziert werden konnten⁸. Dies deckt sich mit den hier vorliegenden Ergebnissen. Bemerkenswert war jedoch, dass bei immunoelektrophoretischer Untersuchung, auch beim Frischaufbereitungs-extrakt, in Diskrepanz zur einfachen Agarelektrophorese im Bereich der α_2 - und β -Zonen nur schwache Präzipitate sichtbar wurden. Das mag daran liegen, dass infolge Antigenüberschuss die für die Präzipitation notwendigen Bedingungen nicht optimal waren; es muss aber auch daran gedacht werden, dass es sich bei den mit einfacher Elektrophorese anfärbbaren Proteinkomplexen etwa um stark lipoidhaltige Komponenten handelt, die im Serum kein immunologisches Äquivalent besitzen.

(2) *Niere*. Bei immunologischer Analyse von Nierenhomogenisaten gelang es uns, im Durchschnitt fünf bis sechs Komponenten mit je zwei bis drei Subfraktionen, insgesamt bis zu 15 Einzelfraktionen, zu differenzieren. Sie zeigen eine weitgehende Identität mit entsprechenden Serumproteinen. Bemerkenswert ist jedoch im Bereich der α -Globuline ein kontinuierlicher Übergang der Präzipitationslinie einer α_1 -Fraktion in eine langsam wandernde stark auspräzipitierte α_2 -Fraktion, was beweist, dass zwischen diese beiden Komponenten eine enge immunologische Verwandtschaft besteht. Auffallend ist, dass zwar die β_{2A} -Fraktion, nicht aber das β_{2M} -Protein zur Darstellung gelangten.

(3) *Milz*. Die immunoelektrophoretische Analyse von Milz-Homogenisaten ergab durchschnittlich fünf bis sechs Komponenten mit je zwei bis drei Subfraktionen, d.h. insgesamt 12 Einzelfraktionen. Besonders fällt hier auf, dass das mit dem Albumin wandernde α -Globulin aussergewöhnlich stark auspräzipitiert ist, wogegen alle anderen Fraktionen, abgesehen vom γ -Globulin, wesentlich schwächer ausgeprägte Präzipitationslinien zeigen. Die α -Globuline sind insgesamt mit ihren Subfraktionen am stärksten vertreten. Bemerkenswert ist, dass auch bei Milz-Homogenisaten das β_{2M} -Protein fehlt, während die β_{2A} -Fraktion zur Darstellung gebracht werden konnte.

(4) *Herzmuskulatur*. Homogenisate von Herzmuskulatur lassen bei immunologischer Analyse bis zu sechs Komponenten mit je ein bis zwei Subfraktionen, insgesamt also etwa 10 Einzelfraktionen erkennen. Die einzelnen Fraktionen sind, gemessen an der Intensität der Präzipitate, untereinander quantitativ gleichwertig. Die Albuminfraktion ist verhältnismässig schwach entwickelt.

Die meisten Subfraktionen sind im α -Bereich nachweisbar. Hier fällt u.a. eine α_2 -Fraktion auf, die mit dem α_2 -Serumlipoprotein identisch sein dürfte. Nicht konstant ist im β -Bereich das Siderophilin darstellbar. Das Makroglobulin der α_2 - und auch der β_2 -Gruppe fehlt; ebenso wird die Albuminvorfraktion vermisst.

(5) *Skelettmuskulatur*. Die immunoelektrophoretische Analyse von Skelettmuskulatur lässt vier bis fünf Komponenten mit je etwa zwei Unterfraktionen, insgesamt maximal neun Fraktionen erkennen. Zunächst zeigen sich in auffälliger Weise zwei Präzipitationslinien, die weitbogig einerseits vom Albumin- bis in den β -Globulinbereich, andererseits aus der Zone der α_2 -Globuline bis in die Zone der γ -Globuline reichen. Innerhalb der beiden langgestreckten Präzipitationslinien lassen sich weitere Eiweiss-Systeme mit verschiedener elektrophoretischer Mobilität abgrenzen. Das β_2 -

Makroglobulin ist nicht nachweisbar. Die sichere Zuordnung einer Präzipitationslinie zum β_{2A} -Immunglobulin des menschlichen Serum gelingt ebenfalls nicht.

(6) *Magenschleimhaut*. Homogenisate von Magenschleimhaut lassen auf Grund der vorliegenden immunoelektrophoretischen Ergebnisse bis zu sechs Komponenten mit allenfalls je zwei Unterfraktionen, insgesamt also bis zu neun Eiweiss-Systeme erkennen. Die Albuminfraktion ist relativ schwach ausgeprägt. Im β -Bereich fällt neben den β_1 -Proteinen eine langsamer wandernde β_2 -Globulinfraktion auf. Gemessen an ihrer Position ist sie aber wahrscheinlich nicht mit den β_{2A} -Immunglobulin identisch. Das β_{2M} -Protein wird vermisst.

Wenngleich diese Ergebnisse somit insgesamt wahrscheinlich machen, dass verschiedene Serumproteine in den einzelnen Organextrakten vertreten sind, ist es auf Grund der einfachen Eiweissfärbung nicht hinreichend möglich, die zur Darstellung gebrachten Präzipitationslinien exakt zu definieren. Insbesondere lassen diese Untersuchungsergebnisse keine sichere Abgrenzung streng spezifischer Reaktionen gegen immunologische Verwandtschaftsreaktionen zu. Um zu exakteren Aussagen über die Qualität der einzelnen Komponenten zu gelangen, erscheint es uns somit erforderlich, unsere bislang erzielten Ergebnisse einerseits durch spezielle Kombinationsverfahren, wie Kohlenhydrat- und Fettfärbung, sowie durch Fermentreaktionen, andererseits durch die Reaktion mit spezifischen Anti-Organseren zu ergänzen. Über die Ergebnisse dieser weiteren Analysen wird gesondert berichtet.

ZUSAMMENFASSUNG

Zur Frage der Identität von Gewebs- und Serumproteinen wurden verschiedene menschliche Organextrakte (Leber, Niere, Milz, Herz- und Skelettmuskulatur, sowie Magenschleimhaut) mit immunoelektrophoretischer Technik einem Normalserum gegenübergestellt. Als Vergleichsmasstab für die immunologische Identität wurde die Reaktion gegen ein Anti-Humanserum gewählt. Die Untersuchungen ergaben, dass jeder der hier analysierten Organextrakte ein eigenes Proteinspektrum mit unterschiedlicher Anzahl, unterschiedlicher quantitativer Relation und unterschiedlicher Mobilität der Proteinkomponenten besitzt. Damit ist ausgesagt, dass sich die Organproteine sowohl untereinander als auch im Vergleich mit einem Normalserum verschieden verhalten. Aus den vorliegenden Analysen darf gefolgert werden, dass zumindest ein Teil der in den Extrakten enthaltenen Eiweisse mit Serumproteinen vergleichbare bzw. identische immunologische Reaktionen aufweist.

SUMMARY

IMMUNOELECTROPHORETIC INVESTIGATION OF THE IDENTITY OF HUMAN TISSUE PROTEINS AND SERUM PROTEINS

In order to find out whether tissue proteins and serum proteins are identical, extracts of various human organs (liver, kidney, spleen, heart muscle, skeletal muscle and mucous membrane of the stomach) were compared with normal serum by means of immunoelectrophoresis. The reaction to anti-human serum was chosen as standard of comparison. The results indicated that each tissue extract examined possesses a specific protein spectrum, the protein components differing in number, amount and mobility. This implies that in their behaviour the tissue proteins differ not only

from each other but also from those of normal serum. The analyses show that for at least some of the proteins present in the extracts the immunological reactions are comparable to or identical with those of serum proteins.

LITERATUR

- ¹ H. D. CREMER UND J. FÜHR, in HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, Bd. V, 10. Aufl., Springer, Berlin, 1953, S. 447.
- ² D. MÜTING, *Der Aminosäure-Haushalt des Menschen*, Editio Cantor, 1958.
- ³ R. DOERR, in *Handbuch der pathologischen Mikroorganismen*, Bd. I, 3. Aufl., Springer, Wien, 1929, S. 803; *Antikörper*, I. Teil, Springer, Wien, 1947, S. 103.
- ⁴ E. VAN DUNGERN, *Münch. med. Wochschr.*, 46 (1899) 1228; *Münch. med. Wochschr.*, 47 (1900) 962.
- ⁵ M. KOIZUMI, *Okayama-Igakkai-Zasshi*, 47 (1936) 1963; *Ref. Ber. ges. Physiol.*, 90 (1936) 495.
- ⁶ K. LANDSTEINER, *The specificity of serological reactions*, Rev. Ed., Harvard University Press, 1945.
- ⁷ S. J. KAPLANSKY, A. E. GURVITSCH UND L. K. STAROSELCEVA, *Biokhimiya*, 23 (1958) 114.
- ⁸ D. NACHKOV UND O. NACHKOVA, *Études immunoélectrophorétiques sur les protéines des tissus hépatiques normaux et infectés par virus*, Institut d'Immunologie, Sofia, 1960.
- ⁹ H. OTT, F. LOHSS UND J. GERGELY, *Klin. Wochschr.*, 36 (1958) 383.
- ¹⁰ R. J. WIEME UND M. RABAAY, *Ärztl. Laborat. Bl.*, 3 (1955) 99.
- ¹¹ CH. HACKMANN, *Arch. pathol. Anat. u. Physiol., Virchow's*, 290 (1933) 749.
- ¹² B. ROMEIS, *Mikroskopische Technik*, Oldenbourg, München, 1948, S. 77.
- ¹³ KJELDAHL in L. HALLMANN, *Klinische Chemie und Mikroskopie*, 9. Aufl., Thieme, Stuttgart, 1960, S. 595.
- ¹⁴ Ö. OUCHTERLONY, *Progr. Allergy*, 5 (1958) 1.
- ¹⁵ H. GÖTZ, G. BERG UND F. SCHEIFFARTH, *Z. Immunitätsforsch.*, 114 (1957) 72.
- ¹⁶ P. GRABAR, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 65.
- ¹⁷ P. GRABAR, *Behringwerke-Mitteilungen*, 30 (1955) 23.
- ¹⁸ P. GRABAR UND A. WILLIAMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 193.
- ¹⁹ J. URIEL UND J. J. SCHEIDEGGER, *Bull. soc. chim. biol.*, 37 (1955) 165.
- ²⁰ C. A. WILLIAMS UND P. GRABAR, *J. Immunol.*, 74 (1955) 158.
- ²¹ L. DEMLING, *Klin. Wochschr.*, 30 (1952) 74; *Gastroenterologia*, Separatum 81 (1954) 130.
- ²² L. DEMLING, H. KINZLMEIER UND N. HENNING, *Z. ges. expth. Med.*, 122 (1954) 416.
- ²³ M. KESSEL, *Clin. Chim. Acta*, 4 (1959) 142.

Lebenslauf

Am 1. 8. 1935 wurde ich, Gertraud Schernthaner, als zweites von vier Kindern des Dipl.-Bergingenieurs Otmar Schernthaner und seiner Ehefrau Hanna, geb. Kießling, in Marktredwitz geboren.

Ich besuchte fünf Jahre die Volksschule in Göpfersgrün und anschließend die Oberrealschule in Wunsiedel, wo ich im Sommer 1954 die Reifeprüfung ablegte. Mein medizinisches Studium begann ich im WS 1954/55 an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen. Nach fünf (vorklinischen) Semestern unterzog ich mich hier der ärztlichen Vorprüfung und hatte anschließend Gelegenheit, im Rahmen des Studentenaustausches Berlin—Bundesrepublik an der Freien Universität Berlin zu studieren. Im SS 1958 kehrte ich nach Erlangen zurück und begann mit meiner Promotionsarbeit. Nachdem ich den experimentellen Teil im Frühjahr 1959 zum Abschluß bringen konnte, ging ich für das SS 1959 an die Universität Freiburg i. Bsg. Im WS 1959/60 war ich wieder in Erlangen eingeschrieben und legte hier im Frühjahr 1960 das medizinische Staatsexamen ab.

Zur Zeit bin ich als Medizinalassistentin an der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen tätig.

Erlangen, den 30. 10. 1960

Gertraud Schernthaner

